



TITLE:

方向選択的局所二値化法 (DSL T) と反復領域分割アルゴリズムによる葉内三次元構造の抽出と解析(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

川瀬, 貴士

CITATION:

川瀬, 貴士. 方向選択的局所二値化法 (DSL T) と反復領域分割アルゴリズムによる葉内三次元構造の抽出と解析. 京都大学, 2015, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18830>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博 士（理 学）	氏名	川瀬 貴士
論文題目	方向選択的局所二値化法（DSLTL）と反復領域分割 アルゴリズムによる葉内三次元構造の抽出と解析		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>近年、三次元画像から得られた構造データの抽出と定量化の重要性が増してきている。正確かつ詳細な構造データを抽出し、定量化するためには染色などによる可視化と画像の領域分割が必要不可欠である。しかし、植物の葉のような空気間隙が存在する組織では、屈折率の不一致により共焦点レーザー顕微鏡や多光子顕微鏡などで明瞭な像を得ることが難しいという問題があった。本研究では、この問題を解決するためにナイルレッド/シリコーンオイル溶液を用いた染色法を開発した。ナイルレッド/シリコーンオイル溶液を用いた可視化法には以下のような利点がある。①毒性が無い。②表面張力が低いので葉を浸すだけで葉内へ侵入し、内部まで可視化できる。③濡れ性が高いので、撥水性のある葉等の染色を容易に行うことができる。④屈折率が水に近いので葉内で屈折率の不一致が起こらない。⑤使用しているシリコーンオイルは揮発性が高いので除去が容易。⑥水溶液を使用する場合のように浸透圧を考慮して調製を行う必要が無い。⑦長期間にわたるタイムラプス撮影が可能。⑧一度の処理で空気間隙と細胞を異なる蛍光で可視化できる。⑨モデル植物以外の様々な種にも使用可能。⑩使用されたシリコーンオイルとナイルレッドは安価であり、手に入りやすい。</p> <p>一方、構造データを定量化するには、目的の構造や領域を画像から分割・抽出しなければならない。領域分割の際に問題となる組織内部でのSN比(signal-to-noise ratio)の低下に対応するため、新たな局所二値化法の一つである方向選択的局所二値化法(direction-selective local thresholding [DSLTL])と反復領域分割アルゴリズムも開発した。反復領域分割アルゴリズムでは構造を抽出するために様々な方法を用いることができるが、本研究ではDSLTLを構造抽出のために利用した。本研究で開発した染色法と領域分割アルゴリズムを用いることによって従来法より優れた精度で生きた葉の三次元画像から細胞と空気間隙の形状を抽出することに成功した。</p> <p>解析ツールとしてユーザーに提供するために、DSLTL を利用した反復領域分割アルゴリズムを実装し、グラフィカルユーザーインターフェイスを備えたソフトウェアを公開した(https://github.com/nsllab2000/DSLTL)。このソフトウェアには DSLTL と反復領域分割アルゴリズム以外にも、ガウシアンフィルタなどの基本的なフィルタ機能や、明度補正、セグメント修正機能等を実装されている。これにより、自動抽出を行った後の修正や前処理を単独で行えるようになっている。また、詳細なマニュアルもソフトウェアと共に公開している。マニュアルには、公開されているサンプル画像を領域分割する手順と各処理のパラメータを全て掲載しており、ユーザーへの配慮も行き届いている。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

共焦点レーザー顕微鏡や多光子顕微鏡などの三次元イメージング技術は細胞・組織・個体の構造データを取得する上で非常に重要である。得られた構造データを定量化することによって二次元的な解析では同定することのできない表現型を同定できるようになる。詳細な解析を行うには三次元的な解析が必要になってくるが、その際問題となるのが空気間隙と細胞を分ける方法である。川瀬氏が開発したナイルレッド/シリコンオイル染色法は細胞と空気間隙を同時に異なる色で可視化することができるだけでなく、植物体への影響も小さく抑えることができる。さらに、繰り返し染色することによって5日間以上のタイムラプス撮影にも成功している点で高く評価できる。

先行研究で報告されているペルフルオロデカリンは、葉を浸けるだけで葉内に侵入して屈折率の不一致を解消するので、葉内の観察が可能になる。しかし、細胞などを可視化するためには、別途染色を行う必要があった。現在、このナイルレッド/シリコンオイル溶液を用いた可視化法は、加圧または減圧処理等を行わずに葉内の可視化を単独で行える唯一の方法であると言える。ナイルレッド/シリコンオイル溶液を用いた可視化法は空気間隙をもつ組織内部の可視化のために開発されたものであるが、処理が極めて容易であるため空気間隙が存在しない組織の染色にも適用する価値もある。本研究ではナイルレッドを使用しているが、ナイルレッドの誘導体などの他の化合物を用いることで改良の可能性がある。特に、細胞膜のみを染色できるようになれば、現在より形状の抽出が容易になり、領域分割の精度もさらに高くなると考えられる。このように本研究の内容は、組織の染色法に一つのブレークスルーを与えたものとしても評価できる。

次いで、川瀬氏は構造データの定量化を目指して、画像から目的の構造や領域を抽出する領域分割についての技術開発を行った。川瀬氏が開発した方向選択的局所二値化法(DSLT)はH-minima TransformやTensor Votingといった従来の方法より優れた精度で画像から構造を抽出することができる。また、処理の並列化が容易で大幅な高速化が可能であるため、処理速度の面でも従来法より優れた技術と言える。

DSLITとあわせて開発した反復領域分割アルゴリズムによって葉の三次元画像から高い精度で細胞と空気間隙を抽出することが可能になった。さらに、この方法は細胞の輪郭が可視化されている画像であれば葉以外の画像にも適用できるので、様々な組織の三次元的な解析に利用できる。DSLITを含む反復領域分割アルゴリズムはGPGPUによる並列処理によって高速化されており、標準的な画像サイズ(512×512×120程度)の場合には数分で処理が終了する。一回の処理が短時間で終了するため、一回の処理時間が長い場合に問題になりがちなパラメータ調節が容易であり、精度の高い結果をある程度短時間で得ることができる。従って、十分な実用性を備えていると考えられる。川瀬氏は、考案した領域分割アルゴリズムを利用したデータ処理を補助するためにグラフィカルユーザーインターフェース(GUI)を備えたソフトウェアを開発し公開した。

本研究で開発された可視化法と領域分割アルゴリズムは、葉の三次元的な発達の仕組みの解明を可能にただけでなく、その汎用性の高さから文字・物体認識や神経回路抽出など様々な分野で利用できる可能性がある点が非常に興味深い。本論文の内容の一部は、植物科学の有力国際学術誌の一つである*The Plant Journal*誌に掲載された。川瀬氏が実施した研究の質は高く、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年1月29日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。